植 物 分 类 与 资 源 学 报 2013, 35 (5): 547～554
Plant Diversity and Resources DOI: 10.7677/ynzwyj201312148

DNA 条形码在中国金合欢属中的应用*

欧阳铖人[1,2], 孙 航[2], 李志敏[1**], 张建文[2**]
(1 云南师范大学生命科学学院, 云南 昆明 650092; 2 中国科学院昆明植物研究所生物多样性与生物地理学重点实验室, 云南 昆明 650201)

摘要: 根据形态特征难以准确地辨别金合欢属植物, DNA 条形码技术提供了一种准确地鉴定物种的方法。本文利用条形码技术对中国金合欢属物种的序列 (*psb*A-*trn*H、*mat*K、*rbc*L 和 ITS) 及其不同组合进行比较, 通过计算种内和种间变异进行 barcoding gap 分析, 运用 Wilcoxon 秩和检验比较不同序列的变异性, 构建系统树。结果表明: 4 个片段均存在 barcoding gap, ITS 序列种间变异率较 *psb*A-*trn*H、*rbc*L 和 *mat*K 序列有明显优势, 单片段 ITS 正确鉴定率最高, ITS+*rbc*L 片段联合条码的正确鉴定率最高, 因此我们认为 ITS 片段或条形码组合 ITS+*rbc*L 是金合欢属的快速鉴别最理想的条码。

关键词: ITS; *rbc*L; *mat*K; *psb*A-*trn*H; DNA 条形码; 金合欢属; 物种鉴定
中图分类号: Q 949.7, Q 946.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 2095-0845(2013)05-547-08

Application of DNA Barcoding in Chinese *Acacia* s.l. (Leguminosae)

OU YANG Cheng-Ren[1,2], SUN Hang[2], LI Zhi-Min[1**], ZHANG Jian-Wen[2**]
(1 *School of Life Science*, *Yunnan Normal University*, Kunming 650092, China; 2 *Key Laboratory of Biodiversity and Biogeography*, *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650201, China)

Abstract: It is difficult to identify Chinese species of *Acacia* accurately based on morphological assessment unless an intact specimen is at hand. In contrast, DNA barcoding through the analysis of short DNA sequences from a small sample of tissue can provide an accurate method for identifying species. In this study, we used four DNA fragments (*rbc*L, *mat*K, *psb*A-*trn*H, and ITS) to develop a potential barcoding method for Chinese *Acacia*. Our analysis involved calculating inter- and intra-specific genetic distances, conducting Wilcoxon signed rank tests to analyze the sequence variation, and constructing phylogenetic trees from distance data. The results showed that barcoding gaps exist between *Acacia* species for each of the four sequences, with ITS showing highest inter-specific divergence. Both the use of ITS on its own and in combination with *rbc*L sequence variation gave the highest level of species identification. We therefore propose the use of ITS sequence variation on its own or combined with *rbc*L as a DNA barcode for identifying *Acacia* species in China.

Key words: *Acacia*; ITS; *rbc*L; *mat*K; *psb*A-*trn*H; DNA barcoding; Species identification

DNA 条形码 (DNA barcoding) 是利用特殊的、可用于物种鉴定的 DNA 序列来鉴别物种的工具, 该技术已被用于物种的鉴定和新种的发现 (Li 等, 2011; Liu 等, 2011)。自加拿大生物学家 Hebert 等 (2003) 正式提出 DNA 条形码概念后, 条形码技术迅速成为国际上生物分类学研究的热点 (宁淑萍等, 2008; 任保青和陈之端, 2010)。DNA 条形码在植物类群中的研究随之展开, 国内外许多学者进行积极的探索, 主要从叶绿体基因组和核基因组中寻找理想的 DNA 条形码

* 基金项目: 中科院大科学装置工程项目 (2009-LSFGBOWS-01)、国家自然科学基金项目 (31061160184)
** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: lizhimin_vip@163.com; zhangjianwen@mail.kib.ac.cn
收稿日期: 2012-11-08, 2013-03-20 接受发表
作者简介: 欧阳铖人 (1988-) 男, 硕士研究生, 主要从事植物系统与生物地理学研究。E-mail: oycr6018@126.com

(闫化学和于杰, 2010; Chase 等, 2005)。Kress 等(2005) 利用9个叶绿体片段 (*trn*K-*rps*16、*trn*H-*psb*A、*rp*136-*rps*8、*atp*B-*rbc*L、*ycf*6-*psb*M、*trn*V-*atp*E、*trn*C-*ycf*6、*psb*M-*trn*D) 以及基因片段 ITS 对整个被子植物类群进行分析, 提出 ITS 和 *trn*H-*psb*A 组合是较好的选择。Kress 和 Erickson (2007) 提出 *rbc*L 和 *trn*H-*psb*A 组合作为整个陆地植物的条形码。生物条形码联盟 (CBOL) (2009) 推荐 *mat*K 和 *rbc*L 组合作为陆地植物的核心条形码。随后, 有学者提出将 ITS 作为种子植物研究的核心条码, 并得到学者们的认同 (Chen 等, 2010; Gao 等, 2010; Wang 等, 2011; China Plant BOL Group, 2011; Logacheva 等, 2008)。总之, 植物 DNA 条形码的研究工作已全面展开, 叶绿体片段 (*psb*A-*trn*H、*mat*K、*rbc*L) 和核基因片段 ITS 已广泛的应用于植物 DNA 条形码的研究中 (Liu 等, 2011; Fu 等, 2011; Du 等, 2011; China Plant BOL Group, 2011)。

金合欢属 (*Acacia*) 是世界特大属之一, 该属在全世界分布约1 200种, 主要分布于大洋洲和非洲 (吴德邻, 1988; 孙航, 2006), 中国约16种, 3变种 (孙航和陈介, 1990)。传统金合欢属被独立为5个属, 即 *Acacia*、*Senegalia*、*Vachellia*、*Acaciella* 和 *Mariosousa* (Maslin 等, 2003), 中国自然分布的金合欢属植物应属于 *Senegalia*, 鉴于中国及邻国的植物志仍然使用广义的 *Acacia* 名称, 为了使用的方便, 我们在这里仍然沿用广义金合欢属的概念 (孙航和陈介, 1990; Sun, 2006; Nielsen, 1985; 吴德邻, 1988; Wu, 2010)。金合欢属植物属内鉴别困难是本属分类的焦点问题之一, 因该属植物在种间形态上差别不大, 几乎都为头状花序、二回羽状复叶, 小叶形态、大小等有较高的相似度, 在标本不完整时鉴定很困难, 且属内分类也存在较大的争议 (孙航和陈介, 1990; Wu, 2010)。鉴于金合欢属在形态鉴定的困难, 急需一种方法来弥补形态分类学中的不足, 而 DNA 条形码技术的出现使金合欢属植物快速鉴定成为可能, 如 Newmaster 和 Ragupathy (2009) 利用 *psb*A-*trn*H、*mat*K 和 *rbc*L 条形码实现 DNA 条码技术对金合欢属植物近缘种类快速鉴定。本研究将利用叶绿体 DNA 片段 (*psb*A-*trn*H、*mat*K、*rbc*L) 和核基因片段 ITS 从分子水平上解决形态分类学中存在的问题, 实现中国金合欢属种类的快速鉴别。

1 材料与方法

1.1 实验材料

金合欢属实验材料主要来自野外采集, 少部分来源于腊叶标本, 从 GenBank 中下载部分数据, 材料种类及来源见表1。本实验研究材料共39个个体代表该属15个种及2个变种, 采集生长良好, 无病斑的幼叶, 用硅胶快速干燥后带回实验室, 采集2~5株代表个体作为凭证标本, 凭证标本保存于中国科学院昆明植物研究所标本馆 (KUN)。

1.2 实验方法

每个样品称取约15 mg, DNA 的提取采用 OMEGA 试剂盒提取, 并参照试剂盒方法提取总 DNA。ITS 扩增采用 White 等 (1990) 设计的通用引物 ITS1 和 ITS4, *psb*A-*trn*H 引用 Miller 等 (2003) 使用的引物, *rbc*L 参照 Fay 等 (1997) 使用的引物, *mat*K 参照 Yu 等 (2011) (表2)。

扩增反应采用20 μL 反应体系, 包括30~60 ng 的模板 DNA, 2 μL 10×PCR 反应缓冲液, 1.6 μL $MgCl_2$ (25 $mmol \cdot L^{-1}$), 1.6 μL dNTP 混合液 (10 $mmol \cdot L^{-1}$) 正反引物各1 μL (10 $mmol \cdot L^{-1}$), Taq DNA 聚合酶0.5单位。反应程序如下: 94 ℃预变性4 min, 94 ℃变性1 min, 55 ℃退火1 min, 72 ℃延伸1 min, 35个循环, 最后72 ℃延伸7 min。扩增得到的 PCR 产物在1.5%的琼脂糖胶上电泳, 在 ABI 3700 测序仪上测序, 由测序公司完成。

1.3 数据分析

测定的序列编辑和拼接用软件 Sequencher 4.14 完成, 使用软件 BioEdit (Hall, 1999) 和 Clustal W1.83 (Thompson 等, 1994) 进行校正和多重序列比对, 并进行了相应的手工调整。

种内、种间遗传距离基本采用 K2P 模型计算 (Kimura-2-parameter distance)。Wilcoxon 秩和检验可以用来评估种内和种间变异的分布是否存在重叠, 用来比较各片段序列之间的变异性差异 (Kress 和 Erickson, 2007)。DNA 条形码的指标是 barcoding gap 是否存在, 即用柱形图表示种间和种内的遗传距离分布频率, 对所研究的片段进行检验。本文使用 MEGA 5.0 (Tamura 等, 2011) 软件计算种内、种间遗传距离, 并构建能体现种内、种间遗传距离的分布柱形图。通过 Wilcoxon 秩和检验来检验各片段序列之间的变异性差异。物种的分辨率也是评价 DNA 条形码的一个重要指标。若每个种的所有个体都聚为一个单系分支则认为该物种鉴定正确 (宁淑萍等, 2008; Hollingsworth 等, 2009)。利用 MEGA 5.0 软件 (Tamura 等, 2011) 构建系统树 (UPGMA, NJ, MP, ML), 建树时采用 K2P 模型, 所有对位排列结果中的空位 (gaps) 或缺失数据 (missing data) 作完全删除 (complete deletion) 处理, 系统树的每个分支的支持率以自展支持率 (bootstrap) 进行检验, 以5 000次重复运算。

表 1　实验材料及来源

Table 1　Origins of materials

种名 Species	采集地 Locality	凭证标本 Voucher（KUN）	GenBank 序列号 ITS	*rbc*L	*mat*K	*psb*A-*trn*H
鸭皂树	西双版纳 Xishuangbanna	孙航等 9609	KF532059	KF532022	————	KF531983
Acacia farnesiana	永胜 Yongsheng	孙航 15634	KF532075	KF532038	————	KF531999
儿茶	西双版纳 Xishuangbanna	孙航等 9608	KF532064	KF532027	KF531950	KF531988
A. catechu	西双版纳 Xishuangbanna	董金龙 C06012	KF532079	KF532043	KF531964	KF532003
尖叶相思	孟定 Mengding	王焕冲等 20110222	KF532062	KF532025	KF531948	KF531986
A. caesia	盈江 Yingjiang	孙航 1498	KF532073	KF532041	KF531959	KF531997
羽叶金合欢	西双版纳 Xishuangbanna	孙航等 9611	KF532058	KF532021	KF531945	KF531982
A. pennata	峨山 Eshan	欧阳铖人 OY010	KF532072	KF532037	KF531958	KF531996
滇南金合欢	西双版纳 Xishuangbanna	孙航等 9603	KF532057	KF532020	KF531944	KF531981
A. tonkinensis	西双版纳 Xishuangbanna	孙航等 9614	KF532077	KF532036	KF531962	KF532001
海南金合欢	金平 Jinping	王焕冲等 20110182	KF532061	KF532024	KF531947	KF531985
A. hainanensis	屏边 Pingbian	毛品一 3922	KF532076	KF532040	KF531961	KF532000
钝叶金合欢	新平 Xinping	孙航 15776	KF532056	KF532019	KF531943	KF531980
A. megaladena	元江 Yuanjiang	孙航 15792	KF532070	KF532035	KF531956	KF531994
var. *megaladena*	新平 Xinping	孙航 15781	KF532086	KF532049	KF531971	KF532010
盘腺金合欢 *A. mega-*	凤庆 Fengqing	孙航 15765	KF532089	KF532013	KF531937	KF531974
ladena var. *garrettii*	老挝 Laos	孙航 12484	KF532088	KF532051	KF531973	KF532012
粉被金合欢	六库 Liuku	孙航 15758	KF532055	KF532018	KF531957	KF531979
A. pruinescens	西双版纳 Xishuangbanna	孙航等 9613	KF532071	KF532034	KF531942	KF531995
阔叶相思树	鹤庆 Heqing	孙航 15732	KF532054	KF532014	KF531938	KF531975
A. delavayi var.	永胜 Yongsheng	孙航 15622	KF532078	KF532017	KF531941	KF531978
delavayi	鹤庆 Heqing	冯国楣 844	KF532090	KF532033	KF531963	KF532002
盐丰金合欢	泸定 Luding	孙航等 15148	KF532053	KF532016	KF531940	KF531977
A. teniana	石棉 Shimian	孙航等 15152	KF532069	KF532032	KF531955	KF531993
	禄劝 Luquan	陈林杨 009	KF532085	KF532048	KF531970	KF532009
云南金合欢	盐源 Yanyuan	孙航等 15031	KF532052	KF532015	KF531939	KF531976
A. yunnanensis	冕宁 Mianning	孙航等 15045	KF532068	KF532031	KF531969	KF531992
	冕宁 Mianning	孙航等 15054	KF532084	KF532047	KF531954	KF532008
昆明金合欢	峨山 Eshan	武素功 209	KF532063	KF532026	KF531972	KF531987
A. delavayi var.	昆明 Kunming	邱炳云 50141	KF532074	KF532042	KF531949	KF531998
kunmingensis	西畴 Xichou	孙必兴 708	KF532087	KF532050	KF531960	KF532011
藤金合欢	西双版纳 Xishuangbanna	孙航等 9612	KF532060	KF532023	KF531946	KF531984
A. concinna	景东 Jingdong	孙航 12048	KF532080	KF532039	KF531965	KF532004
银荆	昆明 Kunming	欧阳铖人 OY033	KF532065	KF532028	KF531951	KF531989
A. dealbara	昆明 Kunming	欧阳铖人 OY034	KF532081	KF532044	KF531966	KF532005
黑荆	昆明 Kunming	欧阳铖人 OY036	KF532066	KF532029	KF531967	KF531990
A. mearnsii	昆明 Kunming	欧阳铖人 OY040	KF532082	KF532045	KF531952	KF532006
台湾相思	昆明 Kunming	欧阳铖人 OY037	KF532067	KF532030	KF531953	KF531991
A. confusa	昆明 Kunming	欧阳铖人 OY038	KF532083	KF532046	KF531968	KF532007

种名 Species	GenBank 序列号 ITS	*rbc*L	*mat*K	*psb*A-*trn*H	种名 Species	GenBank 序列号 ITS	*rbc*L	*mat*K	*psb*A-*trn*H
A. melanoxylon	JF420093	HM849736	HM850601	JF420206	*A. tortilis*	JQ265926	EU213441	JF270618	JQ230201
A. melanoxylon	JF420314		JF419987		*A. subrigida*	JF420086		JF419986	JF420199
A. auriculiformis	JX856395	JX856619			*A. subrigida*	DQ029251			JF420200
A. auriculiformis	JX856534	JX856620			*A. victoriae*	JF420087		AF274226	
A. cyclops	JF420024	JQ412305	JQ412187	JF420134	*A. victoriae*	DQ029278			
A. cyclops	JF420248		JF419923		*A. chartacea*	DQ029263			
A. longifolia	JF420332	HM849735	HM850600	JF420225	*A. chartacea*	DQ029241			
A. longifolia	JF420111		JF420006		*A. rigens*	JF420108		JF420003	JF420222
A. mucronata	JF420107		JF420002		*A. rigens*	FJ868405			
A. mucronata	JF420329				*A. karroo*	JQ265837	JF265252	JF270609	AF524992
A. tortilis	JQ265928	EU213443	JX850063	JQ230203	*A. karroo*	JQ265837	EU042178	AF274137	

表2 PCR扩增引物及序列

Table 2 Polymerase chain reaction primers and conditions used for amplification and sequences

Gene and region	Name of primer	Primer sequence 5′-3′	Origin
*rbc*L	1f 724r	ATGTCACCACAAACAGAAAC TCGCATGTACCTGCAGTAGC	Fay *et al.*, 1997
*mat*K	472F 1248R	CCCRTYCATCTGGAAATCTTGGTTC GCT RTRATAATGAGAAAGATTTCTGC	Yu *et al.*, 2011
*trn*H-*psb*A	*trn*H^{GUG} *psb*A	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Miller *et al.*, 2003
ITS	ITS1 ITS4	AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	White *et al.*, 1990

2 结果

2.1 PCR扩增和测序成功率

DNA片段引物通用性是条形码评价的重要标准之一（Kress等，2005）。本研究选用的4个DNA片段都表现较好的PCR扩增效率和测序效率（表3），*rbc*L和*psb*A-*trn*H引物的通用性（PCR扩增和测序成功率）表现最好，为100%；ITS和*mat*K各有少量样品测序失败，PCR测序成功率为90%。

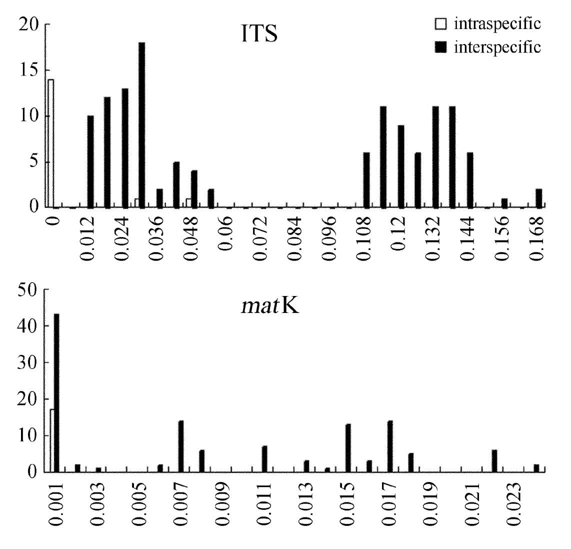
2.2 Barcoding gap的评估和Wilcoxon秩和检验

表3 四个候选片段序列及扩增、测序效率表

Table 3 PCR amplification and sequencing success rate of four candidate segments

Potential barcode	Aligned length/bp	Variable sites/bp	PCR success/%	Sequencing success/%
*rbc*L	678	36	100	100
*mat*K	755	32	100	90
ITS	599	116	100	90
*psb*A- *trn*H	540	36	100	100

Barcoding gap是评价DNA条形码的标准之一。理想的DNA条形码检测到的种间遗传变异应明显大于种内遗传变异，形成一个明显的间隔区，在理想状况下，柱形图上的种内变异会集中在数值较小的一侧，而种间变异则集中在数值较高的一侧（Meyer和Paulay，2005）。在4个片段遗传距离分布图中（图1），ITS片段的种间遗传变异最大，种内和种间存在明显的barcoding gap，叶绿体片段*psb*A-*trn*H、*mat*K和*rbc*L在0.001～0.004有重叠，但仍表现出一定的barcoding gap。Wilcoxon秩和检验可以用来评估种内和种间变异的分布的差异（Kress和Erickson，2007）。利用Wilcoxon秩和检验对不同序列种内和种间的变异进行统计分析，结果表明4个片段的种内变异率无明显差别（表4），种间变异率则表现出一定的差异（表5），ITS的种间变异最大，*psb*A-*trn*H的种间变异最小，即ITS>*rbc*L>*mat*K>*psb*A-*trn*H。



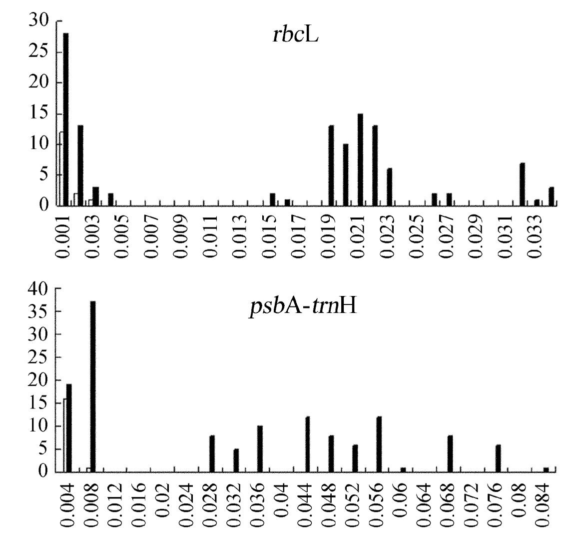


图1 四个候选片段的种内种间遗传变异（X轴：K2P遗传距离；Y轴：分布频率）

Fig. 1 Comparisons of frequency distribution of intra- and inter- specific pairwise distances among four barcoding candidate segments（x axis：pairwise distance；y axis：frequency distribution）

2.3　物种分辨率

物种分辨率是评价 DNA 条形码的另一个重要指标，条形码分析中通常采用标准的分子系统学方法建立多种系统树，目的是为了检验每个物种的单源性，即同一物种的不同个体能否紧密聚类到一起（宁淑萍等，2008）。不同的建树方法可能得到不同的效果，通过 K2P 模型对 4 种方法（UPGMA，NJ，MP，ML）的比较发现 UPGMA 和 NJ 分析较 MP 和 ML 有较高的物种分辨率（表 6），而 NJ 树常在 DNA 条形码研究中广泛使用（宁淑萍等，2008）。四个 DNA 片段中 ITS 有较高的物种分辨率，通过 UPGMA 和 NJ 分析构建的 ITS 系统树能较好的分辨不同的物种（表 6）。*mat*K、*rbc*L 和 *psb*A-*trn*H 单独使用时物种分辨率较低，只能识别 22.7% ~38.4% 的种类，联合叶绿体片段时分辨率升高（43.6% ~61.5%），联合 ITS 和叶绿体片段时能较好的分辨金合欢属的种类（82.1% ~86.7%），联合 ITS+*rbc*L 时有最高分辨率，与 3 个片段联合和 4 个片段联合具有相同的物种鉴定效率（表 6）。

表 4　种内遗传变异的 Wilcoxon 检验

Table 4　Wilcoxon test of pairwise intra-specific variation

W+	W-	Relative Ranks	N	*P* value	Result
ITS	*rbc*L	W+=7，W-=13	17	*P*=0.600	ITS=*rbc*L
ITS	*psb*A-*trn*H	W+=2，W-=8	17	*P*=0.273	ITS=*psb*A-*trn*H
ITS	*mat*K	W+=0，W-=6	17	*P*=0.109	ITS=*mat*K
*rbc*L	*mat*K	W+=2，W-=8	17	*P*=0.273	*rbc*L=*mat*K
*rbc*L	*psb*A-*trn*H	W+=2，W-=4	17	*P*=0.593	*rbc*L=*psb*A-*trn*H
*mat*K	*psb*A-*trn*H	W+=2，W-=1	17	*P*=0.655	*mat*K=*psb*A-*trn*H

表 5　种间遗传变异的 Wilcoxon 检验

Table 5　Wilcoxon test of pairwise inter-specific variation

W+	W-	Relative Ranks	N	*P* value	Result
ITS	*rbc*L	W+=9094，W-=86	136	*P*≤0.001	ITS>*rbc*L
ITS	*psb*A-*trn*H	W+=376，W-=8803	136	*P*≤0.001	ITS>*psb*A-*trn*H
ITS	*mat*K	W+=0，W-=8911	136	*P*≤0.001	ITS>*mat*K
*rbc*L	*mat*K	W+=1322，W-=5580	136	*P*≤0.001	*rbc*L>*mat*K
*rbc*L	*psb*A-*trn*H	W+=8848，W-=66	136	*P*≤0.001	*rbc*L>*psb*A-*trn*H
*mat*K	*psb*A-*trn*H	W+=71，W-=7803	136	*P*≤0.001	*mat*K>*psb*A-*trn*H

表 6　条形码重新构建中国金合欢属系统树单源性的百分比

Table 6　Percent of *Acacia* species recovered as monophyletic based on phylogenetic trees for each barcode in China

Potential barcode	UPGMA	NJ	MP	ML
*rbc*L	22.7 (18.7)	22.7 (18.7)	22.7 (18.7)	22.7 (18.7)
*mat*K	33.3 (31.3)	33.3 (31.3)	30.6 (31.3)	30.6 (31.3)
ITS	78.8 (74.1)	78.8 (74.1)	74.2 (58.2)	74.2 (58.2)
*psb*A-*trn*H	38.4 (37.5)	38.4 (37.5)	33.3 (33.3)	33.3 (33.3)
*rbc*L+*mat*K	43.6 (37.5)	43.6 (37.5)	41.7 (31.3)	41.7 (31.3)
*rbc*L+*psb*A-*trn*H	51.3 (45.0)	51.3 (45.0)	41.7 (31.3)	41.7 (31.3)
*mat*K+*psb*A-*trn*H	51.3 (42.8)	51.3 (42.8)	52.8 (31.3)	52.8 (31.3)
*rbc*L+*mat*K+*psb*A-*trn*H	61.5 (65.0)	61.5 (65.0)	55.6 (37.5)	55.6 (37.5)
ITS+ *rbc*L	86.7 (81.3)	86.7 (81.3)	78.8 (76.3)	78.8 (76.3)
ITS+*mat*K	82.1 (71.4)	82.1 (71.4)	82.1 (71.4)	82.1 (71.4)
ITS+*psb*A-*trn*H	82.1 (71.4)	82.1 (71.4)	82.1 (71.4)	82.1 (71.4)
ITS+*rbc*L+*mat*K	86.7 (87.5)	86.7 (73.1)	86.7 (73.1)	86.7 (73.1)
ITS+*psb*A-*trn*H+*rbc*L	86.7 (73.1)	86.7 (73.1)	86.7 (73.1)	86.7 (73.1)
ITS+*rbc*L+*mat*K+*psb*A-*trn*H	86.7 (73.1)	86.7 (73.1)	86.7 (73.1)	86.7 (73.1)

Resolved species with bootstrap >70% are in brackets. ITS: internal transcribed spacer; ML: maximum likelihood; MP: maximum parsimony; NJ: neighbor joining; UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic mean



图2 ITS+*rbc*L 基于 K2P 模型构建金合欢属的 NJ 树

Fig. 2 A neighbor joining tree of Kimura-2-parameter distances based on ITS+*rbc*L for *Acacia* species

3 讨论

3.1 DNA 条形码的评价

DNA 条形码是一种精确的物种鉴别工具，核心工作之一是寻找适合的条形码片段。条形码最基本的评价是引物通用性和 barcoding gap 的评价（Kress 等，2005；Meyer 和 Paulay，2005）。本研究中，4 个候选片段都表现较好的通用性（表3），ITS 相对测序成功率较低，可能与核基因存在多拷贝有关（Li 等，2011）。Barcoding gap 分析中，4 个候选条形码片段种内和种间遗传距离分析表明 4 个片段均存在 barcoding gap，种内遗传变异都无显著差异，种间遗传变异差异明显，表现为 ITS 片段的种间遗传变异最大，其次是 *rbc*L，而 *psb*A-*trn*H 最小。基于 4 个片段均具有

良好的扩增效率和测序成功率，且都存在 barcoding gap，我们认为 4 个片段都适合作为金合欢属的候选条码。

3.2 物种分辨率评价

物种的分辨率是评价 DNA 条形码的一个重要指标（Hollingsworth 等，2009）。本研究中，单片段鉴定能力为 ITS 最高，*rbc*L 最低，即：ITS>*psb*A-*trn*H>*mat*K>*rbc*L。ITS 能较好的区分金合欢属的种类，绝大部分种类均能形成单系分支，表现出较好的物种分辨能力（78.8%）。基于 ITS 在物种分辨率方面有明显的优势，所考察的候选序列中具有较大的种间变异和物种鉴定成功率，引物的通用性较高，符合标准条形码的要求，故认为 ITS 适合作为金合欢属植物标准条形码的候选条码。单片段 *rbc*L 和 *mat*K 的物种鉴定率较低，分别为 22.7% 和 33.3%，但与其他片段组合能提高物种的正确鉴定率，两者均具有较高的引物通用性，因此可以作为候选条码。*psb*A-*trn*H 具有较高的引物通用性，Wilcoxon 秩和检验种间变异在候选片段最小，然而其物种的正确鉴定率却比 *rbc*L 和 *mat*K 高，达 38.4%。我们对 *psb*A-*trn*H 序列排列比对时发现该片段存在较多的插入和缺失位点，有学者认为利用好插入/缺失有助于物种鉴定（赵月梅和张玲，2011；Liu 等，2011；Newmaster 和 Ragupathy，2009）。

物种鉴定中多个条形码片段的组合比单一片段往往能更有力的区别物种（CBOL Plant Working Group，2009；Fu 等，2011）。联合核心条形码（*rbc*L+*mat*K）时，能解决 43.6% 的金合欢属种类，远比使用单一条形码高（*rbc*L 22.7%、*mat*K 33.3%），但这与 CBOL（2009）推荐 *rbc*L+*mat*K 作为核心条形码能解决 72% 种类差异较大，因为 CBOL 评价的种类是综合不同种类，我们的结果仅仅是中国分布的金合欢属种一级别的鉴定。当 ITS+*rbc*L 组合时显示最高的正确鉴定率，能解决 86.7% 的种类，绝大部分种类聚为单系分支，且具有较高的内部支持率（图 2），表现出高的物种分辨能力。与 3 个条形码组合和 4 个条形码组合具有相同的物种鉴定效率。因此，我们建议使用 ITS+*rbc*L 组合作为标准条形码来精确地鉴定金合欢属植物。

综上所述，ITS 片段或者 ITS+*rbc*L 组合有较高的物种鉴定效率，并且两个片段均存在 barcoding gap，因此我们认为 ITS 片段或 ITS+*rbc*L 作为标准条形码来鉴定金合欢属植物是较为合适的。

3.3 分类学问题的修订

DNA 条形码技术除帮助鉴定现有的物种外，还能帮助解决一些分类学问题，发现新的物种或隐种（Newmaster 和 Ragupathy，2009）。金合欢属植物在特殊的环境影响下，有些种类形态或遗传结构已经发生了变化，需要用 DNA 条形码的方法结合形态特征来重新评估现有物种的分类地位，在本研究结果中，羽叶金合欢和海南金合欢分别聚集于不同的分支上（图 2），此两种也曾因外部形态高度相似，而被合并（Wu，2010），利用 DNA 条形码技术，很容易将二者分开，因此，支持孙航和陈介（1990）将羽叶金合欢和海南金合欢作为两个独立类群的处理。

致谢 中国科学院西双版纳植物园董金龙，中国科学院昆明植物研究所高山植物多样性研究组周卓、邓涛、王洽、牛洋、陈永生、岳亮亮、朱鑫鑫、陈林杨和王焕冲帮助采集或提供材料，宋敏舒在实验中给予指导，彭德力在论文修改中给予建议。

〔参 考 文 献〕

Chen SL, Yao H, Han JP *et al*., 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PloS One*, **5**: e8613

China Plant BOL Group, 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **108**: 19641—19646

CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **106**: 12794—12797

Chase MW, Salamin N, Wilkinson M *et al*., 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360** (1462): 1889—1895

Du ZY, Yang CF, Chen JM *et al*., 2011. Testing four barcoding markers for species identification of Potamogetonaceae [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **49** (3): 246—251

Fay MF, Swensen SM, Chase MW, 1997. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae) [J]. *Kew Bulletin*, **52** (1): 111—120

Fu YM, Jiang WW, Fu CX, 2011. Identification of species within

Tetrastigma (Miq.) Planch. (Vitaceae) based on DNA barcoding techniques [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **49** (3): 237—245

Gao T, Yao H, Song JY *et al*., 2010. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2 [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, **130**: 116—121

Hall TA, 1999. BioEdit: a user friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95—98

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL *et al*., 2003. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **270**: 313—321

Hollingsworth ML, Clark AA, Forrest LL *et al*., 2009. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species level sampling in three divergent groups of land plants [J]. *Molecular Ecology Resources*, **9**: 439—457

Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA *et al*., 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **102**: 8369—8374

Kress WJ, Erickson DL, 2007. A two locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbc*L gene complements the non-coding *trn*H-*psb*A spacer region [J]. *PLoS One*, **2**: e508

Li M, Cao H, Shaw PC *et al*., 2011. Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **49** (3): 271—283

Liu J, Möller M, Gao LM *et al*., 2011. DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus* L., Taxaceae) and the discovery of cryptic species [J]. *Molecular Ecology Resources*, **11**: 89—100

Logacheva MD, Valiejo-Roman CM, Pimenov MG, 2008. ITS phylogeny of West Asian *Heracleum* species and related taxa of Umbelliferae-Tordylieae W. D. J. Koch, with notes on evolution of their *psb*A-*trn*H sequences [J]. *Plant Systematics and Evolution*, **270**: 139—157

Maslin BR, Miller JT, Seigler DS, 2003. Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae) [J]. *Australian Systematic Botany*, **16**: 1—18

Meyer CP, Paulay G, 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling [J]. *PLoS Biology*, **3**: e422

Miller JT, Grimes JW, Murphy, DJ *et al*., 2003. A phylogenetic analysis of the Acacieae and Ingeae (Mimosoideae: Fabaceae) based on *trn*K, *mat*K, *psb*A-*trn*H, and *trn*L/*trn*F sequence data [J]. *Systematic Botany*, **28** (3): 558—566

Newmaster SG, Ragupathy S, 2009. Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical *Acacia* (Mimosoideae, Fabaceae) [J]. *Molecular Ecology Resources*, **9** (s1): 172—180

Nielsen IC, 1985. Leguminosae-Mimosoideae [A]. In: Smitinand T, Larsen K (eds.), *Flora of Thailand* [M]. Bangkok, Thailand: The Forest Herbarium, Royal Forest Department, Vol. 4 (2): 131—222

Ning SP (宁淑萍), Yan HF (颜海飞), Hao G (郝刚) *et al*., 2008. Current advances of DNA barcoding study in plants [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), **16** (5): 417—425

Ren BQ (任保青), Chen ZD (陈之端), 2010. DNA barcoding plant life [J]. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学报), **45** (1): 1—12

Sun H (孙航), 2006. Acacieae [A]. In: Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences (中国科学院昆明植物研究所) (ed.), *Flora Yunnanica* (云南植物志) [M]. Beijing: Science Press, **10**: 293—307

Sun H (孙航), Chen J (陈介), 1990. Taxonomy, distribution and possible floristic origin of the genus *Acacia* from China [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **12** (3): 255—268

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673—4680

Tamura K, Peterson D, Peterson N *et al*., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, **28** (10): 2731—2739

Wang Q, Yu SQ, Liu JQ, 2011. Are nuclear loci ideal for barcoding plants? A case study of genetic delimitation of two sister species using multiple loci and multiple intraspecific individuals [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **49** (3): 182—188

White TJ, Bruns TD, Lee SB *et al*., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J *et al*. (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* [M]. San Diego: Academic Press, 315—322

Wu DL (吴德邻), 1988. Mimosoideae [A]. In: Chen DS (陈德绍) (ed.), *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, **39**: 22—37

Wu DL, 2010. Tribe Acacieae [A]. In: Chen DS (ed.), *Flora of China* [M]. Beijing: Science Press and St. Louis.: Missouri Botanical Garden Press, **10**: 55—59

Yan HX (闫化学), Yu J (于杰), 2010. Current status of the study of DNA barcoding in plants [J]. *Chinese Bulletin of Botany* (植物学报), **45** (1): 102—108

Yu J, Xue JH, Zhou SL, 2011. New universal *mat*K primers for DNA barcoding angiosperms [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **49** (3): 176—181

Zhao YM (赵月梅), Zhang L (张玲), 2011. Using DNA barcoding in genus *Tacca* (Dioscoreaceae) [J]. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **33** (6): 674—682